

PCT/JP 03/11885

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.09.03

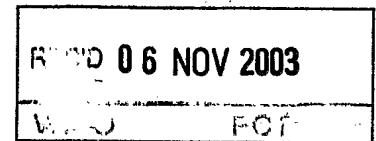
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 2 月 2 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 7 0 4 5 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 7 0 4 5 5]

出 願 人 科学技術振興事業団
Applicant(s):

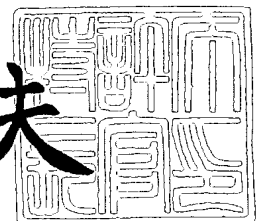


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 7 9 3 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 PJSE068P03

【提出日】 平成14年12月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 37/00
G01B 11/00
G02B 12/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市片瀬海岸 1 - 9 - 1 3 - 1 1 0 3

【氏名】 吉田 賢右

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市つくし野 3 - 9 - 2 センチュリーハイツ
2 - 3 0 1

【氏名】 鈴木 俊治

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市津 1 1 4 7 - 4 1

【氏名】 塩 育

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市小川 2 - 1 0 - 3 町田コープタウン 1 4
- 3 0 8

【氏名】 飯野 亮太

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

【識別番号】 100099265

【弁理士】

【氏名又は名称】 長瀬 成城

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019149

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013152

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 回転式輪帯全反射偏光照明光学系

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を導入しこのレーザ光の照明方向を回転可能にした照明光学系において、常に対物レンズの光軸中心からの放射状方向とは直角方向の s 偏光で照明するようにしたことを特徴とする回転式輪帯偏光全反射照明光学系。

【請求項 2】 回転式輪帯偏光全反射照明光学系において、同系はレーザ光源からの平行ビームを回転させるために任意傾斜を可能にした反射鏡とレーザ光の偏光方向を調整可能にしたポラーライザーとを一体化した偏光反射鏡部を回転する駆動手段とを備えていることを特徴とする回転式輪帯偏光全反射照明光学系。

【請求項 3】 レーザ光源からのレーザ光をスペーシャルフィルター付きビームエキスパンダーによりレーザ光の直径が輪帯光平均直径の $1/2$ 以下となるよう拡大後、回転する偏光反射鏡部に導入することにより、輪帯絞を不要としたことを特徴とする回転式輪帯全反射照明光学系。

【請求項 4】 レーザ光源からのレーザ光をコレクターレンズ中央に配置した 45 度小型反射鏡を経由して回転する偏光反射鏡部に導入し、同偏光反射鏡部で反射した輪帯状平行ビームを再び前記コレクターレンズ辺縁部を経由し対物レンズ瞳面に集光することを特徴とする請求項 1～請求項 3 のいずれかに記載の回転式輪帯全反射照明光学系。

【請求項 5】 上記照明系のコレクターレンズ前側焦点面（視野絞り面近傍）に棒状突起物を光軸中心近傍まで挿入し、回転するレーザ光の回転周期および振動方向を顕微鏡視野内で検知できることを特徴とした請求項 4 に記載の回転式輪帯全反射照明光学系。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、顕微鏡対物レンズ辺縁部にレーザ光を入射させる照明系において、このレーザ光の照明方向を回転可能にした回転式輪帯全反射照明光学系に関する

ものであり、さらに詳細には、偏光エバネセント場を用いて蛍光分子の吸収モードを検出可能にした回転式輪帯偏光全反射照明光学系に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来技術、即ち関連する特許出願は特許文献1に記載のものであり、その回転式輪帯全反射照明機構の概要は下記の通りである。

【0003】

【特許文献1】特願2001-325773

【0004】

前記機構は、顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を導入し物体を照明するケーラー式照明系において、レーザ光による照明方向を顕微鏡対物レンズの軸心を中心に傾斜したまま回転可能としたことを特徴とするものであった。また前記照明系は、顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を導入し全反射させた際に形成されるエバネセント場により蛍光を発光させる照明系であることを特徴とする回転式輪帯全反射照明機構でもあった。この機構は、使用する対物レンズに対し最適な角度でレーザ光を入射するために、反射鏡の傾きを微調整できる機構を備えた反射鏡と、その反射鏡を回転させる手段を供えていることも特徴としていた。また前記反射鏡の回転による振動が顕微鏡に悪影響を及ぼさぬよう、反射鏡を含む回転手段は回転中心軸に形状重量とも対称な構造を持つことを特徴とした回転式輪帯全反射照明機構であった。

【0005】

ここで、顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を入射させ、エバネセント場を用いて蛍光を発光させる全反射照明（エバネセント照明）の原理を図6を参照して簡単に説明する。

図6中、1は対物レンズ、2は油浸オイル、3はカバーガラス、4は水溶液であり、対物レンズ1の辺縁部（通常内角61度、外角68度）にレーザ光を入射すると、ガラスと水溶液の界面で全反射がおこり、この際、界面からの到達距離150nm程度の光がしみだす（この光の場をエバネセント場という）このエバネセント場を蛍光照明に利用すると背景光を著しく減少させることが可能となり

、コントラストの高い蛍光1分子像が得られる。

【0006】

【発明が解決しようとしている課題】

従来技術では、上記のようにコントラストの高い蛍光1分子像が得られるが、蛍光色素1分子の向き、より正確に表現するとその吸収モーメントを検出することは不可能である。蛍光色素の吸収モーメントとはその分子が励起される確率が最大となる向きであり、蛍光色素の分子構造によって決まる。励起光の偏光方向と吸収モーメントが一致した場合、蛍光色素から発せられる蛍光の強度は最大となる。

【0007】

カバーガラス3を経由して水溶液4に向う入射光がp偏光であると形成されるエバネセント場には図7に示すように横波成分(X軸成分)②と、縦波成分(Z軸成分)①が存在し、s偏光が入射するとエバネセント場は図8に示すように完全な横波(Y軸成分)となる(詳細な説明は参考文献:鶴田匡夫著応用光学I[応用物理工学選書1]p37~p42 Ⅲ.全反射とエバネセント波を参照されたい)。

【0008】

蛍光色素の吸収モーメントの検出は、エバネセント場のXY平面上の横波成分をZ軸を中心として回転させることにより可能となる。この時、縦波成分の強度は回転により変化しないので、吸収モーメントの検出には寄与しない。p偏光を入射した場合、エバネセント場は横波成分と縦波成分の両方を持ち、横波成分の強度は小さくなる。一方、s偏光を入射すると形成されるエバネセント場は横波成分だけを持ち、蛍光色素の吸収モーメントをより効率よく検出することが可能となる。蛍光色素1分子を共有結合によりタンパク質やDNA等の観察試料1分子に強固に固定した場合、観察試料の内部構造の変化や全体の向きの変化を吸収モーメントの向きの変化として1分子レベルで検出することも可能となる。

【0009】

横波成分(Y軸方向の振動)のみを持つエバネセント場を形成させるためには、光軸中心から放射状方向とは直角方向(meridional plane)のs偏光(図6中の符号5および6で示す)を対物レンズに入反射させることが肝要である。単純

にポーラーライザーを回転させて偏光を対物レンズに導入すると、カバーガラス 3 と水溶液 4 の境界面には s 偏光だけでなく p 偏光も入射することになる。この場合、形成されるエバネセント場は縦波成分（Z 軸成分）と横波成分（X Y 軸成分）の両方を持つことになる。縦波成分（Z 軸成分）はレーザ光の入射位置によらず一定であるので、蛍光色素の吸収モーメントの検出には寄与しない。横波成分（X Y 軸成分）は入射位置の変化と共に Z 軸を中心として回転するが、縦波成分も持つことからその強度は減少しており、吸収モーメントの効率の高い検出が困難になる。このように単純な偏光照明を行った場合、蛍光色素の吸収モーメントの方向が困難になるところに問題が存在していた。

【0 0 1 0】

本発明は回転式輪帯全反射照明系において対物レンズ光軸中心から放射状方向とは直角方向（meridional plane）に s 偏光を入射させ、対物レンズ光軸を中心として低速回転させることにより横波成分のみを持つエバネセント場を形成させ蛍光色素の吸収モーメントの方向を検知することを意図としている。蛍光色素 1 分子を共有結合によりタンパク質や DNA 等の観察試料 1 分子に強固に固定することにより、観察試料全体の向きの変化や内部構造の変化を蛍光色素の吸収モーメントの変化として 1 分子レベルで検出することが可能になる。

前記の従来発明は対物レンズに入射する輪帯光を真円とする手段、例えばビーム整形プリズムを付加する等が省略されていた。回転反射鏡の回転中心軸から 45 度の方向から平行ビームを入射した場合、反射した輪帯光は楕円となる。これを真円とするためには、半導体レーザのビーム整形に用いられるアナモフィックプリズムペアー等のビーム整形手段を用いればよい。

本発明では真円となる輪帯照明光にして、ノイズの主な原因となるレーザ光の一次及び二次の回折光を除去した理想的エバネセント照明の実現を目指している。

【0 0 1 1】

【課題を解決するための手段】

このため、本発明が採用した技術解決手段は、
顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を導入しこのレーザ光の照明方向を回転

可能にした照明光学系において、常に対物レンズの光軸中心からの放射状方向とは直角方向の s 偏光で照明するようにしたことを特徴とする回転式輪帯偏光全反射照明光学系である。

また、回転式輪帯偏光全反射照明光学系において、同系はレーザ光源からの平行ビームを回転させるために任意傾斜を可能にした反射鏡とレーザ光の偏光方向を調整可能にしたポラライザーとを一体化した偏光反射鏡部を回転する駆動手段とを備えていることを特徴とする回転式輪帯偏光全反射照明光学系である。

また、レーザ光源からのレーザ光をスペーシャルフィルター付きビームエキパンダーによりレーザ光の直径が輪帯光平均直径の $1/2$ 以下となるよう拡大後、回転する偏光反射鏡部に導入することにより、輪帯絞を不要としたことを特徴とする回転式輪帯全反射照明光学系である。

また、レーザ光源からのレーザ光をコレクターレンズ中央に配置した 45 度小型反射鏡を経由して回転する偏光反射鏡部に導入し、同偏光反射鏡部で反射した輪帯状平行ビームを再び前記コレクターレンズ辺縁部を経由し対物レンズ瞳面に集光することを特徴とする回転式輪帯全反射照明光学系である。

また、上記照明系のコレクターレンズ前側焦点面（視野絞り面近傍）に棒状突起物を光軸中心近傍まで挿入し、回転するレーザ光の回転周期および振動方向を顕微鏡視野内で検知できることを特徴とした回転式輪帯全反射照明光学系である。

【0 0 1 2】

【実施の形態】

図面を参照して本発明に係る回転式輪帯偏光全反射照明光学系の構成を説明すると、図 1 は本発明に係る回転式輪帯偏光全反射照明光学系の具体的実施形態を示す図、図 2 は 45 度小型反射鏡とコレクターレンズ部拡大図、図 3 は回転する反射鏡部の拡大図（ $-\alpha$ 傾斜した場合）、図 4 は回転する反射鏡部の拡大図（ $+\alpha$ 傾斜した場合）の図である。

【0 0 1 3】

図中、21 はレーザ光源、22 は反射鏡、23 は $1/4$ 波長板、24 は第 1 凸レンズ、25 はスペーシャルフィルター、26 は第 2 凸レンズ、27 A は 45 度入

射小型反射鏡（図2参照）、27Bは接続金物（図2参照）、28は光源出射ビーム、29は拡大ビーム、30は棒状突起物、31は駆動手段としての可変速モーター、32は偏光反射鏡部を構成する回転する反射鏡、33は反射鏡33に固定した偏光板、34Aは -2α 傾いた拡大ビーム、34Bは $+2\alpha$ 傾いた拡大ビーム、35は視野絞り、36はコレクターレンズ、37はダイクロイックミラー、38は対物レンズ、39は油浸オイル、40はカバーガラス、41は水溶液である。

【0014】

図1には具体的な実施形態の1例を示す。

レーザ光源21からの光は反射鏡22で重直方向に反射し、 $1/4$ 波長板23で円偏光となり、第1凸レンズ24でスペーシャルフィルター25の位置に集光する。このビームはガウス分布を持つものであるが、スペーシャルフィルター25のピンホールを通過した光は $1/e^2$ 強度以下の強度分布をもつ0次光および1次、2次回折光等は除外され、第2凸レンズ26によって再び平行光束となる。（ピンホール大きさは計算で定め、位置は光学調整で定める）第1凸レンズ24とスペーシャルフィルター25、第2凸レンズによっていわゆる凸レンズ-凸レンズ方式のビームエキスパンダーが構成される。

【0015】

光源出射ビーム28と拡大ビーム29のビームエキスパンダー倍率は個々のレーザ光源21によって定めるが拡大ビーム29はビームエキスパンダーを経由した光の直径が輪帯光平均直径の $1/2$ 以下が良い。

45度入射小型反射鏡27Aは図2に示すようにコレクターレンズ36の表面に直径が輪帯光平均直径の $1/2$ 以下にして正確に45度傾斜を持つ固定金物に接着等で固定されている。拡大ビーム29は45度入射小型反射鏡27Aによって回転する反射鏡32の方向に進む。反射鏡32の表面側近傍には棒状突起物30が設けられており、この位置はコレクターレンズ36の前側焦点面に相当し、棒状突起物30は光軸中心まで挿入してあるので、回転するレーザビームの回転方向を顕微鏡視野内で検知することができる。

【0016】

回転する偏光反射鏡部の拡大図は図3の回転する反射鏡部の拡大図（ $-\alpha$ 傾斜した場合）に示すように可変速モーター31、回転中心軸と直角をなす平面に回転する反射鏡32が $-\alpha$ 傾いて固定されている。回転する反射鏡32には偏光板33が接着等によって固定され、これらによって偏光反射鏡部を構成している。

この偏光反射鏡部では、回転する反射鏡32が $-\alpha$ 傾いていると図3に示すように反射光は -2α 傾いた拡大ビーム34Aとなり、同様に図4の回転する反射鏡部の拡大図に示すように回転する反射鏡32が $+\alpha$ 傾いていると反射光は $+2\alpha$ 傾いた拡大ビーム34Bとなる。

【0017】

図5は回転する反射鏡の傾斜方向と偏光板の振動方向を示す図であるが、表面反射鏡11は偏光板12が接着されており、偏光板12の振動方向13は表面反射鏡11の傾斜方向（傾き角）とは互いに直交する方向に調整されている。

これは予め表面反射鏡11の傾斜方向と偏光板12の振動方向13を直交させるか、又は偏光板12の振動方向を回転可能な機構にして、表面反射鏡11を必要な角度を傾斜させた後に、偏光板12の振動方向13と表面反射鏡11の傾斜方向（傾き角）とを互いに直交する方向に調整すればよい。

図5に示すように入射した円偏光14は偏光板12を通過すると直線偏光15となり、表面反射鏡11から反射光は光軸中心からの放射状方向とは直角方向にs偏光で照明することができ図6の条件が満たされる。

もしも、偏光板12の振動方向13を表面反射鏡11の傾斜方向（傾き角）と平行な方向に調整すれば、光軸中心からの放射状方向と平行なp偏光で照明することになる。

【0018】

回転する反射鏡32の接近した位置には不必要の視野周辺光を除外する適宜構成からなる視野絞り35が設けられている。これらの拡大ビーム34A、34B（図1参照）はコレクターレンズ36を通過すると光軸と平行ビームとなり、ダイクロイックミラー37で反射した光は、対物レンズ38の瞳面に集光する。

可変速モーター31を回転すると真円の輪帯状光が、対物レンズ38の瞳面に結像し、油浸オイル39を経由して、カバーガラス40と水溶液41の境界面で

全反射し、界面からの到達距離 150 nm 程度のエバネセント場が形成される。このエバネセント場を蛍光照明に使うと背景光を著しく減少させ、コントラストの高い蛍光 1 分子像が得られる。

【0019】

可変速モーター 31 を低速度で回転させると蛍光色素の吸収モーメントとエバネセント場の偏光方向が一致した際に最大の蛍光強度が得られる。また通常可視化されていない偏光の振動方向も棒状突起物 30 によって顕微鏡視野の 1 部が遮蔽されるので容易に検知できる。これらの組み合わせを応用すると例えば、回転するタンパク質 1 分子に蛍光 1 分子を強固に結合させることにより、その回転速度を可変速モーター 31 の速度制御系から読み取ることができる。

【0020】

【発明の効果】

以上のように、本発明は回転式輪帯全反射照明において対物レンズ光軸中心から放射状方向とは直角方向 (meridional plane) に s 偏光を入射させることにより意図的に偏光度の高い (Z 軸方向の偏光を含まない) エバネセント場を形成させることができる。

回転可能な偏光照明は蛍光輝度の最大方向の情報から蛍光色素の励起効率の高い方向、即ち吸収モーメントを知ることが出来る。

蛍光色素 1 分子を共有結合によりタンパク質や DNA 等の観察試料 1 分子に強固に固定することにより、観察試料内部の構造や全体の向きのダイナミックな変化を 1 分子レベルで知ることができる。ビームエキスパンダー内のスペーシャルフィルターによってノイズが除外されるので、照明光学系中に対物レンズ瞳面と共役面を設けて輪帯絞りを設置する必要もなく、この共役面を作るためにリレーレンズ系を追加する必要もないので、照明系を短くすることが可能である。

回転するレーザビームの回転周期を顕微鏡視野内で検知できるので偏光の照射される方向を知ることが可能である。

回転する観察試料に蛍光 1 分子を共有結合により強固に固定すると、試料の回転速度を可変速モーター 31 の速度制御系から読み取ることができる、などの優れた効果を奏することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明に係る回転式輸帯偏光全反射照明光学系の具体的実施形態を示す図である。

【図 2】 45度小型反射鏡とコレクターレンズ部拡大図である。

【図 3】 回転する偏光反射鏡部の拡大図（ $-\alpha$ 傾斜した場合）である。

【図 4】 回転する偏光反射鏡部の拡大図（ $+\alpha$ 傾斜した場合）である。

【図 5】 回転する反射鏡の傾斜方向と偏光板の振動方向を示す図である。

【図 6】 エバネセント場を利用した全反射照明の原理図である。

【図 7】 エバネセント波の伝播を示し、p 偏光が入射した場合を示す図である。

。

【図 8】 エバネセント波の伝播を示し、s 偏光が入射した場合を示す図である。

。

【符号の説明】

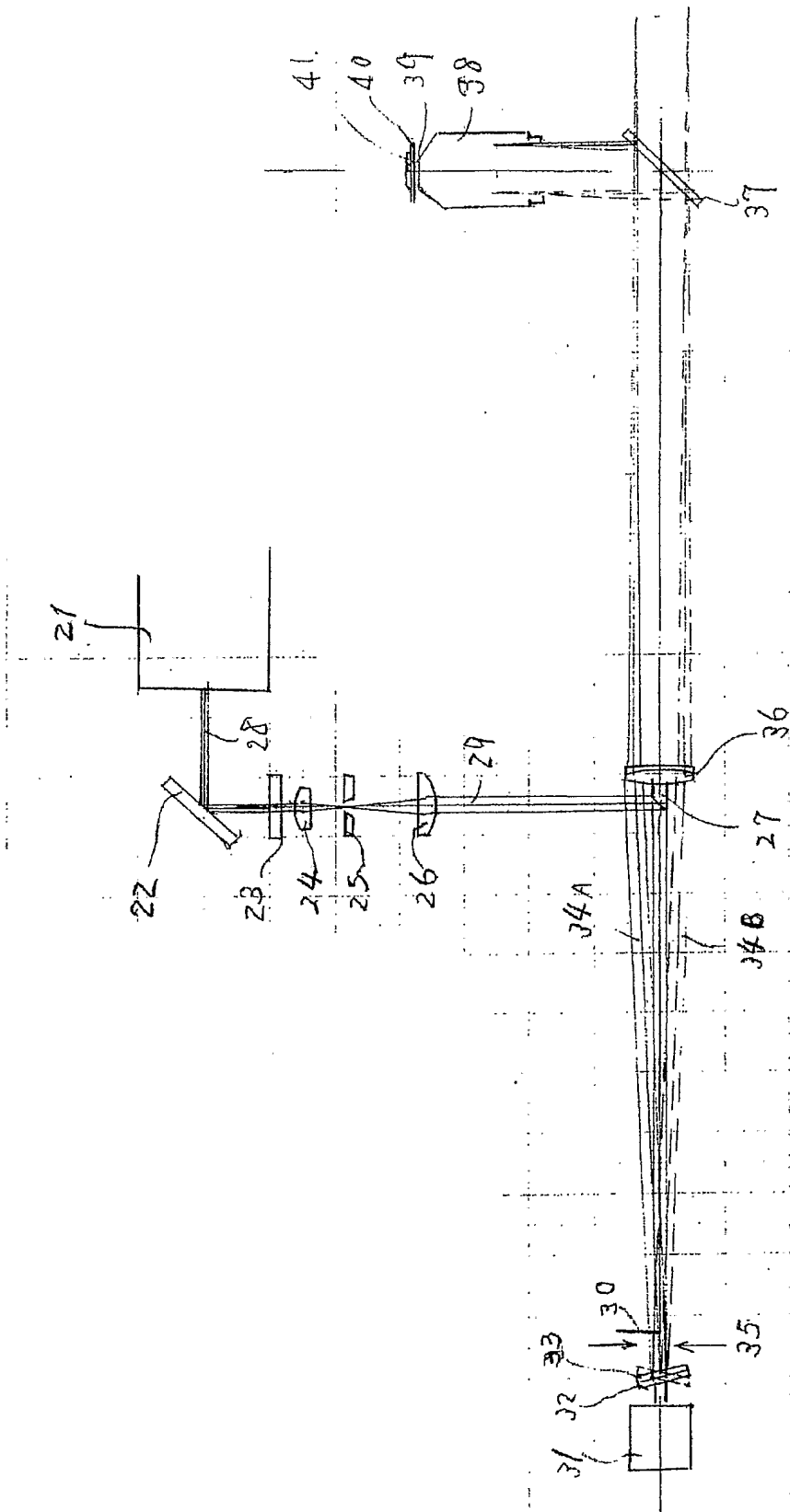
1	対物レンズ
2	油浸オイル
3	カバーガラス
4	水溶液
5	レーザー入射光
6	レーザー反射光
1 1	表面反射鏡
1 2	偏光板
1 3	振動方向
1 4	円偏光
1 5	直線偏光
2 1	レーザー光源
2 2	反射鏡
2 3	1/4 波長板
2 4	第 1 凸レンズ
2 5	スペーシャルフィルター

2 6	第 2 凸レンズ
2 7 A	4 5 度入射小型反射鏡
2 7 B	接続金物
2 8	光源出射ビーム
2 9	拡大ビーム
3 0	棒状突起物
3 1	可変速モーター
3 2	回転する反射鏡
3 3	偏光板
3 4 A	- 2 α 傾いた拡大ビーム
3 4 B	+ 2 α 傾いた拡大ビーム
3 5	視野絞り
3 6	コレクターレンズ
3 7	ダイクロイックミラー
3 8	対物レンズ
3 9	油浸オイル
4 0	カバーガラス
4 1	水溶液

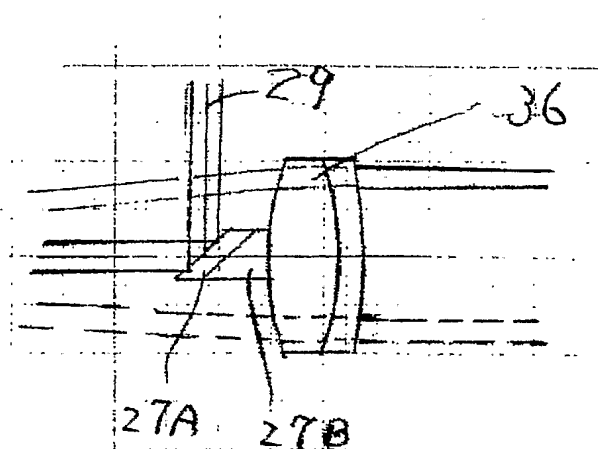
【書類名】

図面

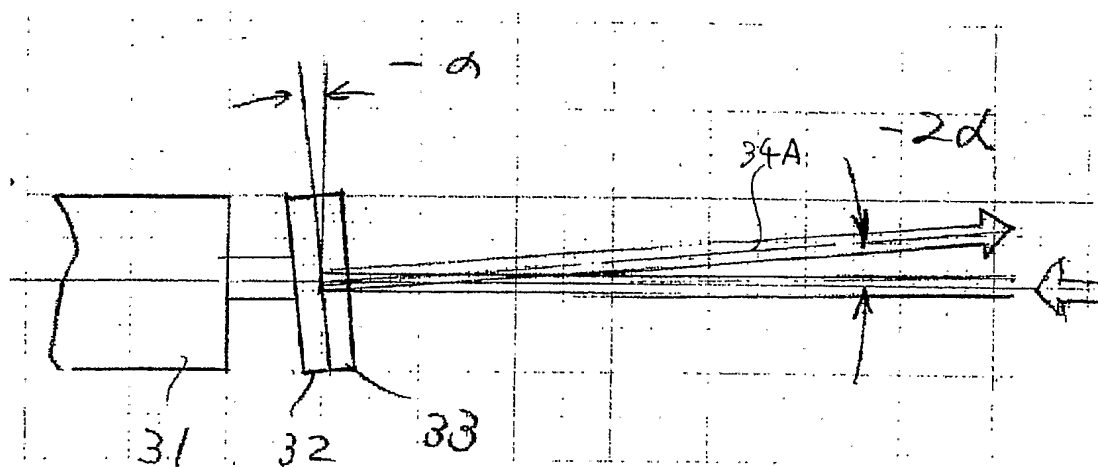
【図 1】



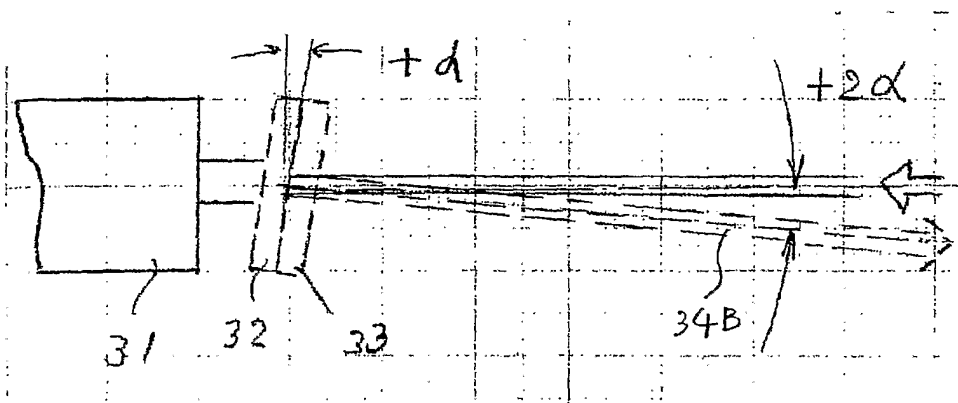
【図 2】



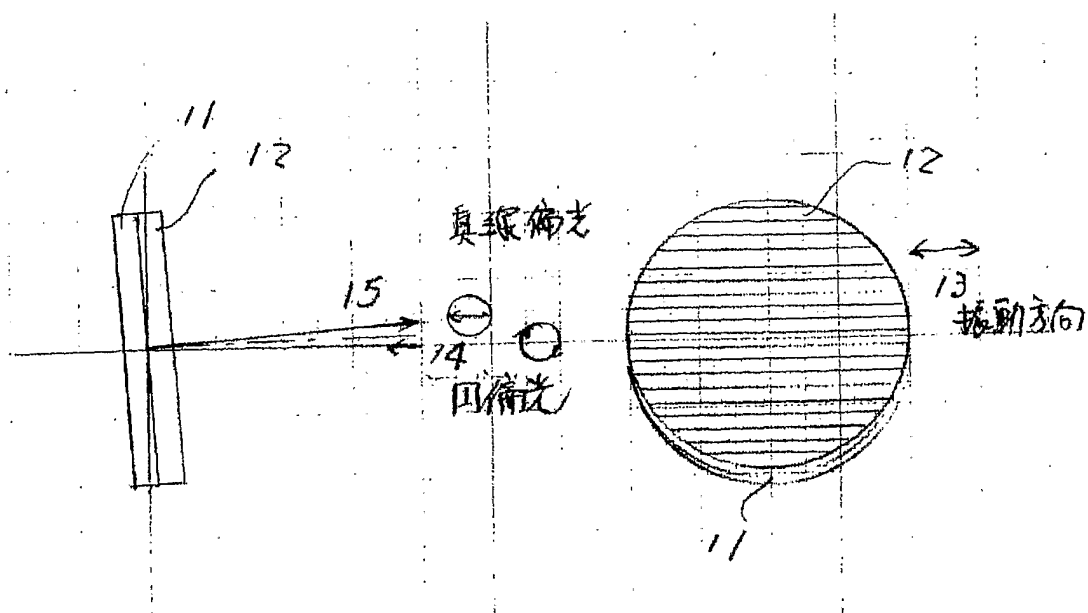
【図 3】



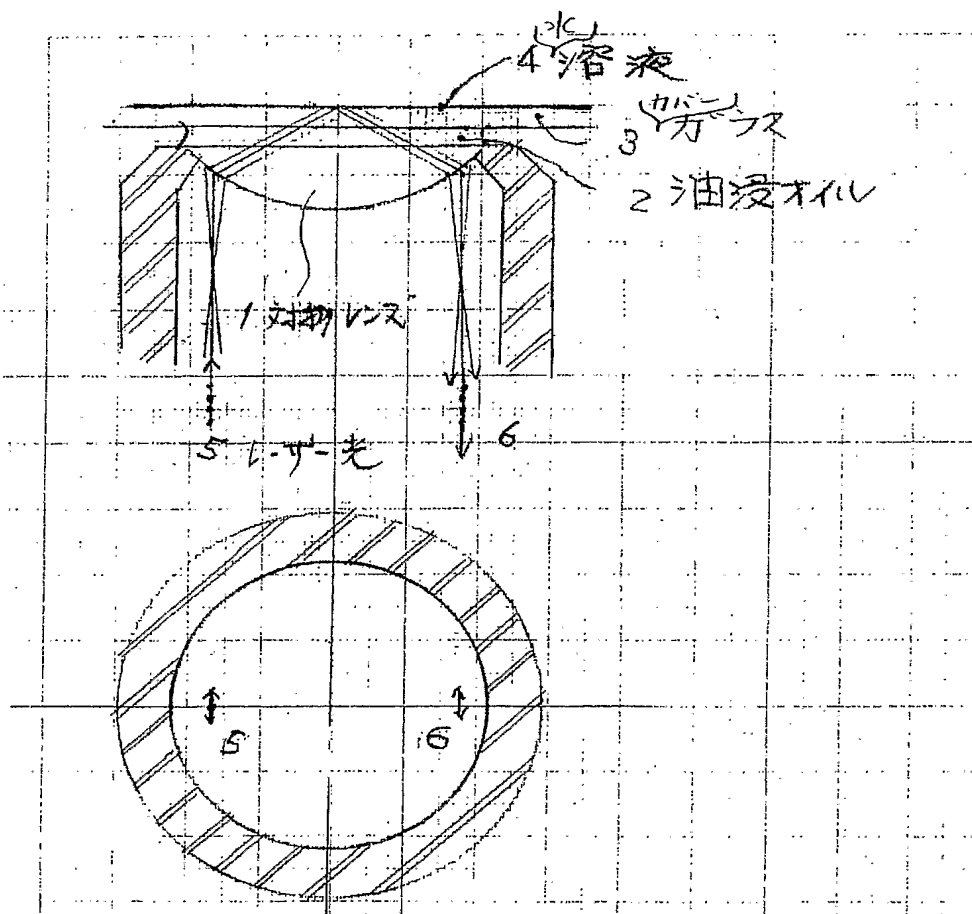
【図 4】



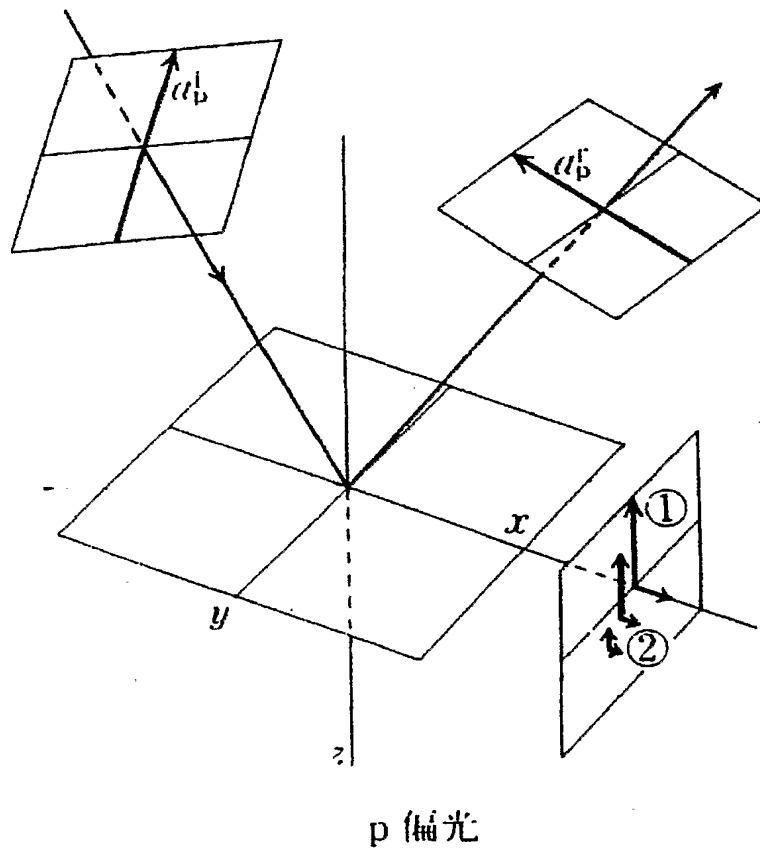
【図 5】



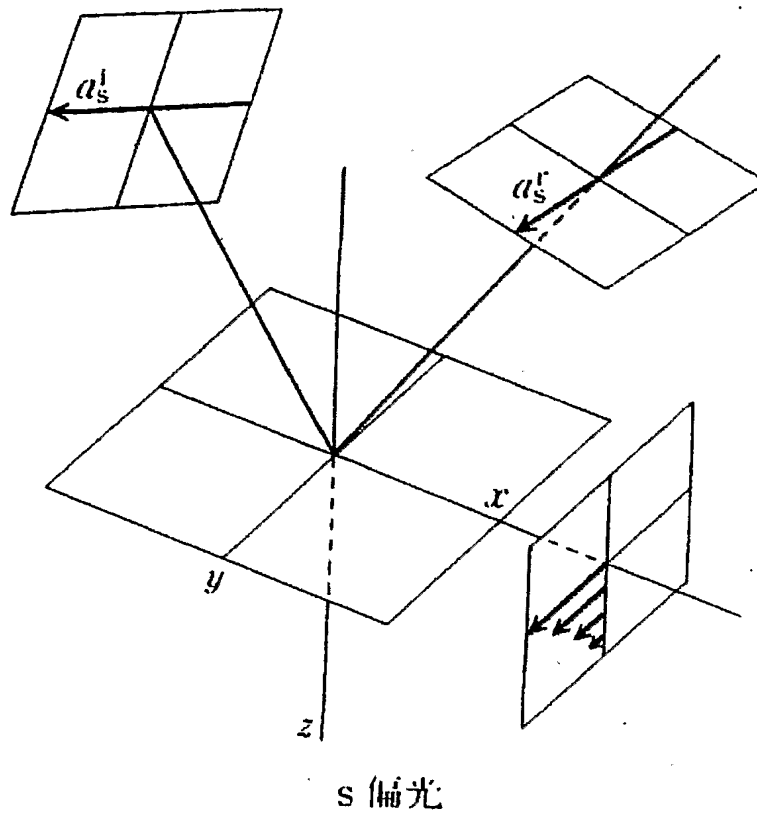
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 回転可能な偏光照明を用いることにより、蛍光強度が最大となる方向の情報から試料に結合させた蛍光色素の励起効率の高い方向、即ち吸収モーメントを知ることができる。蛍光色素1分子をタンパク質1分子に強固に結合させると蛋白質1分子内の構造変化や全体の向きの変化を知ることができ、ダイナミックな動きを個々にとらえることができる照明系を提供する。

【解決手段】 顕微鏡対物レンズの辺縁部にレーザ光を導入しこのレーザ光の照明方向を回転可能にした照明光学系において、常に対物レンズ光軸中心からの放射状方向と直角方向の横波成分のみを持つエバネセント場で照明する回転式輪帯偏光全反射照明光学系とした。また通常可視化されていない回転する偏光の振動方向を照明系に棒状突起物を設けて、顕微鏡視野内で容易に検知できるようにし、回転駆動制御系から回転速度も読み取れる照明光学系とした。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 3 7 0 4 5 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団